©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Protoplasmatische Beobachtungen durch Vitalfärbung an zwei *Nitzschia*-Arten

Von Käthe Cholnoky-Pfannkuche

Mit 34 Textfiguren

Council for Scientific and Industrial Research, National Institut for Water Research, Grahamstown, Südafrika.

In neuerer Zeit wurde die Vitalfärbung vielfach als protoplasmatische Untersuchungsmethode angewandt. Wenn die eindringenden Farbstoffmolekel nicht durch eventuell eintretende Reaktionen farblos werden, können sich gewisse Teile des Protoplasmas optisch manifestieren und so über ihre Rolle im Zellgeschehen Auskunft geben.

Da es völlig unschädliche Farbstoffe nicht gibt, ist nicht anzunehmen, daß die gefärbten Zellteile ihre Funktion nach der Färbung noch ungestört ausüben können. Es ist schon bewiesen worden, daß solche Farbstoffe nicht existieren (B. J. Cholnoky 1937) und die scheinbar unschädlichen Fluorochrome ihre Schädlichkeit nur deshalb nicht offenbaren, weil sie schon in minimalen Mengen sichtbar gemacht werden können, wie das etwa Strugger gezeigt hat (z. B. Strugger 1940). Es würde zu weit führen, die ganze einschlägige Literatur eingehend besprechen zu wollen. Am Ende der Besprechung meiner Ergebnisse werde ich es versuchen, diese den bisherigen Befunden gegenüberzustellen.

Die Auswahl des Subjekts geschah aus einem zellphysiologischen Interesse, da *Nitzschia palea* und *Nitzschia thermalis* stickstoffheterotroph sind und in dieser Hinsicht von den meisten Diatomeenarten abweichen. Es wäre nicht erstaunlich, wenn sie den autotrophen Arten gegenüber auch protoplasmatische Unterschiede zeigten, die u. U. durch vergleichende vitale Färbungen nachzuweisen wären.

Die in unserem Institut angelegten Reinkulturen boten mir eine gute Gelegenheit zu solchen Untersuchungen. Eine Verwendung von Reinkulturen schließt eine Reihe von Fehlerquellen aus, die in Mischkulturen vorliegen. So konnten z. B. Arten, die

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

cytophysiologisch anders reagieren, die Farbstofflösung nicht verändern oder vor den eigentlichen Objekten aufnehmen. Das reinkultivierte Material stand für die Experimente immer reichlich zur Verfügung. Daß sich die Umgebungsfaktoren kaum veränderten, muß nicht besonders betont werden.

Ich stellte mir aus einigen basischen Farbstoffen eine 0,1 %ige Lösung mit destilliertem Wasser her, welche jeweils in dieser und auch in verdünnter Konzentration angewandt wurde. Eine Pufferung der Farblösungen wurde nie vorgenommen, da ich mit der Deckglasmethode arbeitete. Die untersuchten Objekte wurden von der Agarplatte vorsichtig abgenommen und dann in einem Tropfen ihres sterilisierten Standortmediums leicht verteilt ausgestrichen. Eine besondere Beachtung der Farbstoffkonzentration erscheint mir bedeutungslos, da die Lösungen unter dem Deckglas durch Verdünnung und Bindung ihre Konzentration verändern.

Folgende Farbstoffe wurden verwendet: Neutralrot, Neutralviolett, Methylenviolett, Methylenblau, Rhodamin B und Janusgrün.

Die Experimente wurden mehrmals wiederholt und bestätigten, daß der Verlauf der Vitalfärbung immer dem beschriebenen entsprechend blieb. Es sei hier bemerkt, daß der Ausdruck „Vitalfärbung“ irreführend ist und man besser von Farbstoffvergiftung spräche.

Neutralrot

Nitzschia palea: Die Aufnahme des Farbstoffes erfolgt unmittelbar. Die Zellen werden aber in keinem der beobachteten Fälle gleichmäßig angefärbt. Schon am Anfang des Vorganges erschienen kugelrunde, stark rot gefärbte Körner im Protoplasma, wobei auch zwei scharf begrenzte, schwach lichtbrechende Räume sichtbar wurden, die aber nicht mit „Vakuolen“ zu identifizieren waren. In einer normal lebenden *Nitzschia palea*-Zelle ist keine Vakuole, geschweige denn ein Tonoplast zu erkennen. So ist die Annahme, daß sich hier eine Vakuolenkontraktion abspielen sollte, unbegründet und wäre mit den beobachteten Tatsachen nicht in Einklang zu bringen. Es muß wohl angenommen werden, daß die Neutralrotmoleküle das kolloidale Gleichgewicht des Protoplasmas (z. B. durch Ladungsveränderungen, Koagulationen usw.) gestört und das Plasma zu Koazervation gezwungen haben. In Fig. 1 wurde eine beginnende Neutralrotvergiftung dargestellt. Das beobachtete Bild kann erklärt werden, wenn man annimmt, daß die runden Körner eine durch Neutralrot entmischte und inaktivierte Phase des Protoplasmas darstellen, dagegen sind die auf

der Zeichnung hellgrau erscheinenden zwei größeren, mehr oder minder abgerundeten Tropfen die Solphase desselben Entmischungsvorganges. Ganz abgesehen davon, ob man überhaupt berechtigt ist, Vakuolen als Zellorganellen zu unterscheiden, zeigt hier die Lage der Entmischungskugeln und Tropfen, daß sie nicht oder nicht nur dem Vakuom entstammen können. Fig. 2 stellt einen noch weiter entwickelten Entmischungsvorgang dar. Es sind schon vier Soltropfen vorhanden, die aber außer Kolloiden auch molekulardisperse Systeme enthalten und eine semipermeable Hautschicht haben müssen, da sie einen deutlichen Druck auf die anderen, durch die Entmischung deformierten Zellbestandteile, so auch auf die zur Seite gedrückten Chloroplasten ausüben.

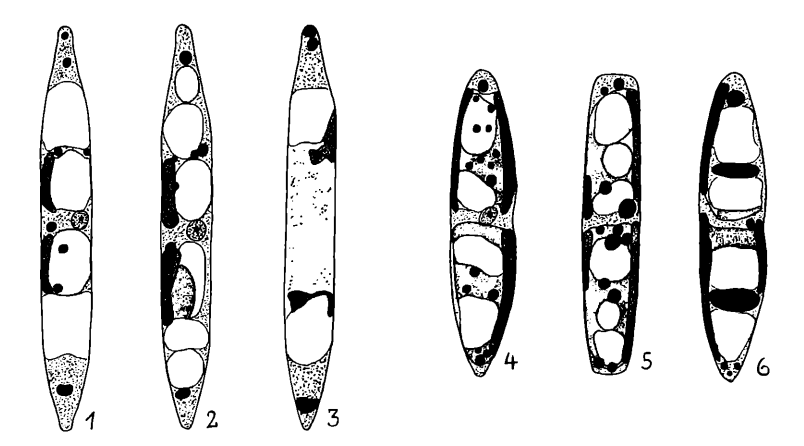


Fig. 1—3. Neutralrotvergiftung. *Nitzschia palea.* — Fig. 4—6. Dasselbe. *N. thermalis.* Einzelheiten vgl. im Text.

Die isolierten Tropfen der Solphase können miteinander verschmelzen (Fig. 3) und durch den beschriebenen inneren Druck die anderen Zellbestandteile mit Plasmabrücke und Zellkern zur Seite schieben. Die vollkommene Desorganisation der Zelle erfolgt innerhalb kürzester Zeit. Hier sei hervorgehoben, daß sich auch die Chloroplasten nicht dem Entmischungsvorgang entziehen können; sie beginnen in den der Fig. 2 ähnlich veränderten Zellen meist zu degenerieren. Das Chlorophyll a tritt aus den Plastiden und wird durch die Öltropfen aufgenommen, die dadurch eine intensiv grüne Färbung bekommen. Das Fucoxanthin bleibt in den Resten der Chloroplasten zurück.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Diese Befunde sind weder mit der Speicherstofftheorie, noch mit der Speicherung in den Vakuolen (volle und leere Zellsäfte) in Einklang zu bringen. Die stark gefärbten Körner sind nicht als Volutin zu identifizieren. Der Begriff „Volutin" ist überdies nicht definiert; er soll Polyphosphatide zusammenfassen, aber weder ihre genaue Zusammensetzung, noch ihre Rolle im Zellgeschehen kann als bekannt gelten. Auch die gefärbten Körnchen in *Cymbella aspera* bei HIRN (1953: 585) dürften nicht so bezeichnet werden können. HIRN konnte das Entstehen der Entmischungskügelchen nicht beobachten und wollte sie nicht nach den bekannten Koazervations-Gesetzen im Sinn BUNGENBERG DE JONGS erklären. Auch eine Beschreibung von „Vakuolen" kann in ihrer Arbeit nicht gefunden werden.

Nitzschia thermalis: Die Aufnahme von Neutralrot und die nachher eintretende Entmischung ist dem Vorgang bei *Nitzschia palea* sehr ähnlich. Die wässerige Phase der Entmischung konnte mindestens am Anfang des Vorganges nicht scharf umgrenzt gesehen werden (Fig. 4). Die Chloroplasten desorganisieren sich aber sehr schnell, wobei das Chlorophyll a ebenso wie bei *Nitzschia palea* in die Öltropfen übergeht und in den Plastiden nur das Fucoxanthin zurückbleibt. Das Chloroplast steht auch in diesen Zellen unter einem starken inneren Druck und wird ganz flach an die Zellwand gedrückt. In den späteren Stadien der Vergiftung kann eine wässerige Phase (oder ein Teil solcher Phasen) in der Form von scharf umgrenzten Tropfen erscheinen (Fig. 5), die aber nicht die bei *Nitzschia palea* beobachteten Ausmaße erreichen. Ein kolloidaler Unterschied scheint auch in den dunkel gefärbten Entmischungskörpern gegeben zu sein, da sie verhältnismäßig groß sein können und unter dem inneren Druck oft zu Klumpen verschmelzen (Fig. 6).

Neutralviolett

Nitzschia palea: Sobald die Farbstofflösung die Zellen erreicht, werden sie unmittelbar angefärbt und zwar ähnlich wie durch Neutralrot. Im Protoplasma erscheinen schnell in Form von kugelrunden, verhältnismäßig kleinen, intensiv gefärbten Körnchen die ersten Entmischungen. Der Vorgang ist wahrscheinlich eine typische Koazervation, wobei ein Koazervat von einer wässerigen Phase geschieden wird. Die wässerige Phase ist aber hier nicht so deutlich sichtbar und abgegrenzt wie bei Neutralrot; umso deutlicher ist aber, daß in dieser Phase kolloidaldisperse Systeme in molekulardisperse verändert werden und daß sich um die wässerige Phase

eine Hautschicht entwickelt, da der Druck dieses dünnen Hydrosols die anderen Bestandteile des Protoplasmas in Zwangsformen drückt (Fig. 7). Die Öltropfen werden zu den Polen geschoben. Auffallend ist die Form des Chloroplasten und des schwach angefärbten Zellkerns. Bei weiterer Vergiftung wird die zentrale Plasmabrücke so stark aus ihrer Position gedrückt, daß man den Zellkern zwischen den Plasmatrümmern nicht mehr entdecken kann (Fig. 8). Die Zellen sind in Zuständen wie in Fig. 7 und 8 mit 1 mol NaCl-Lösung zu plasmolysieren; sie sind als osmotische Systeme also noch intakt geblieben. Das ist nur dann möglich, wenn die Kolloide der Plasmaoberfläche bei den Entmischungsvorgängen nicht in Mitleidenschaft gezogen wurden. Während der Plasmolyse verlieren die Entmischungskugeln schnell ihre intensiv violette Farbe, bleiben aber sichtbar. Die Farbstoffmoleküle verursachen also irreversibele Koazervationen und Koagulationen, die zu Desorganisation und Tod der Zelle führen müssen. Die unmittelbare Ursache des Zelltods ist die Koagulation (Koazervation), wie das schon durch Cholnoky (1937) angenommen wurde. In manchen Fällen konnte man während der Nekrobiose die wässerige Phase scharf abgegrenzt mindestens für eine Zeit im Zellinneren sehen (Fig. 9). Die Tropfen waren aber nie so groß und deutlich wie jene durch Neutralrot. Die Chloroplasten werden durch Neutralviolett ebenso wie durch Neutralrot desorganisiert, das Chlorophyll verlagert sich ebenfalls in die Öltropfen.

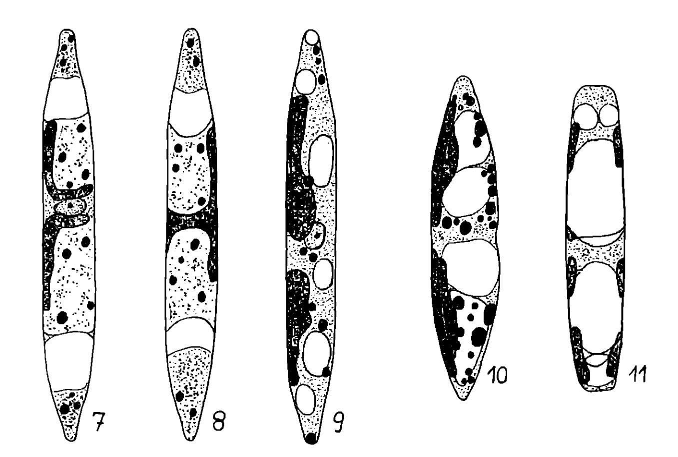


Fig. 7—9. Neutralviolettvergiftung. *Nitzschia palea*. — Fig. 10, 11. Dasselbe *N. thermalis*. Einzelheiten vgl. im Text.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Nitzschia thermalis: Die durch Neutralviolett verursachte Entmischung entwickelt sich ebenso schnell wie bei *Nitzschia palea*. Die entstehenden Entmischungskörper sind aber größer und zahlreicher. Die wässerige Phase ist optisch immer manifest. Die Tropfen sind scharf begrenzt und nehmen durch inneren Druck Zwangsformen an (Fig. 10). In der späteren Entwicklung vergrößern sich die Mengen der „Gleichgewichtsflüssigkeit" (im Sinne BUNGENBERG DE JONGS) und üben einen ständig steigenden Druck auf die Zellbestandteile aus. Fig. 11 zeigt einen solchen Zustand: Die Chloroplasten sind schon gänzlich aus ihrer ursprünglichen Position verschoben, die lebhaft violett gefärbten Körnchen der wässerigen Phase verklumpen. Dieser Ablauf der Vergiftung erinnert stark an die Neutralrotvergiftung der *Nitzschia palea* (Fig. 1—3), hat dagegen wenig Ähnlichkeit zu der der *Nitzschia thermalis* (Fig. 4—6).

Methylenviolett

Nitzschia palea: Zu Beginn färbt Methylenviolett das ganze Protoplasma diffus an; auffällig die starke Färbung des Kerns. Jeder Farbstoff scheint also andere Plasmakolloide anzufärben. Die Richtigkeit dieser Feststellung wird durch die deutliche Kernfärbung bewiesen, die bei Neutralrot und Neutralviolett nicht beobachtet werden konnte. Fig. 12 zeigt den Anfangszustand nach der Anfärbung. Auch die Chloroplasten sind lebhaft violett getönt. Obschon in diesem frühen Stadium keine wasserarmen Koazervatkügelchen sichtbar sind, sind die Plasmakolloide auch hier deutlich aus dem Gleichgewicht gebracht, da neben den gefärbten Chloroplasten scharf umgrenzte, in Abrundung begriffene Räume erscheinen, die der wässerigen Phase nach Entmischungen (Koazervation) entsprechen. Die Viskosität der Kolloide ist in diesen Teilen tatsächlich niedriger als in der Umgebung, wie die lebhafte BROWNsche Bewegung kleiner Körnchen (Koagulate?) zeigt. Die Anfärbung der Chloroplasten ist letal und führt zur Desorganisation dieser Organellen, die ihr Chlorophyll verlieren. Das Chlorophyll wird auch hier durch die Öltropfen aufgenommen, die schon in diesem frühen Zustand hellgrün aufleuchten. Den weiteren Verlauf der Farbstoffvergiftung zeigt Fig. 13. Die scharf umgrenzten Räume mit den dünnen Hydrosolen sind nicht mehr sichtbar, der ganze Zellinhalt ist eine ziemlich einheitliche, körnige Masse geworden, in der erst jetzt lebhaft bläulich gefärbte Körnchen einer wasserarmen Phase auftreten. Diese Veränderungen sind schon prämortal. Sehr rasch erfolgt nun die vollkommene Desorganisation.

Bei *Nitzschia thermalis* verläuft die Vergiftung abweichend. Das ganze Protoplasma und auch der Zellkern werden unmittelbar diffus angefärbt, beinahe gleichzeitig entwickelt sich aber auch eine optisch manifestierte Koazervation, die das Protoplasma in lebhaft gefärbte, wasserarme Koazervatkügelchen und in zwei scharf begrenzte, abgerundete Räume scheidet. Da Methylenviolett sehr giftig ist, tritt der Zelltod nach der Koazervation schnell ein (Fig. 14). Die Koazervation verläuft aber auch hier nicht ganz gleichzeitig mit der Anfärbung. Fig. 15 zeigt eine Zelle (von der

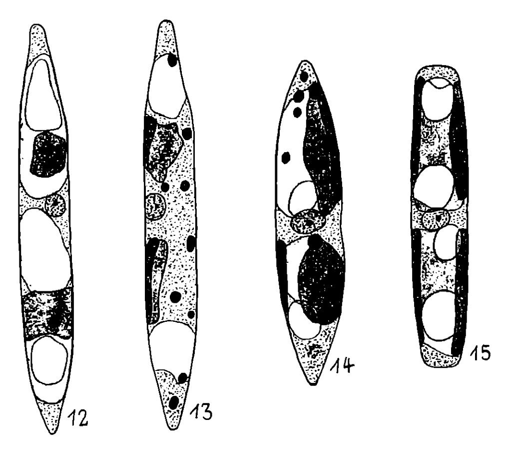


Fig. 12, 13. Methylenviolettvergiftung. *Nitzschia palea*. — Fig. 14, 15. Dasselbe. *N. thermalis*. Einzelheiten vgl. im Text.

Pleuralseite) eben nach dem Eintritt der Farbstoffmoleküle, die sowohl den Kern als auch die Chloroplasten angefärbt haben. Die Bindung der Farbstoffmoleküle zerstört die kolloidale Struktur der Chloroplasten, wodurch auch das Chlorophyll in die Öltropfen diffundieren konnte.

Charakteristisch für diese Lebendfärbung ist die Farbstoffspeicherung im Zellkern und in den Chloroplasten, womit die von den vorher besprochenen grundsätzlich abweicht. Jeder Farbstoff wird durch andere Plasmakolloide gebunden.

Methylenblau

Nitzschia palea: Die eindringenden Moleküle färben auch hier das ganze Protoplasma mit Ausnahme der Chloroplasten. Die Zellkerne sind schwach angefärbt. Auf die diffuse Färbung folgt

©Akademie d. Wiss. Wien; download unter www.biologiezentrum.at

eine sich im ganzen Protoplasma abspielende Koazervation, die stark gefärbte Kügelchen einer wasserarmen Phase sichtbar werden läßt (Fig. 16). Die wasserreiche Phase ist nicht scharf abgegrenzt, die Viskosität des ganzen Protoplasmas scheint, mit der Ausnahme der beschriebenen Kügelchen in den Chloroplasten und im Zellkern, zu sinken, da die kleinen Körnchen in lebhafte BROWNsche Bewegung geraten. Die Chloroplasten scheinen dagegen nicht oder auf eine abweichende Weise vergiftet zu sein. Das Chlorophyll verläßt die Chloroplasten nicht.

In der weiteren Entwicklung der Nekrobiose geht die Koazervation weiter und es wird deutlich eine wäßrige Phase von einer weniger wäßrigen geschieden. Die Räume der dünnflüssigen Kolloide sind scharf begrenzt, vielleicht mit einer Haptogenmembran umgeben und, wie es der Entwicklungsgang beweist, nicht von etwaigen Vakuolen abzuleiten (Fig. 17). Die dünnflüssige Phase übt jedenfalls einen Druck auf die Zellbestandteile aus, die Chloroplasten werden in Zwangsformen gepreßt (Fig. 18). Nach der sekundären Koazervation tritt die vollkommene Desorganisation sehr schnell ein.

Bei *Nitzschia thermalis* verläuft der Vorgang anders. Am Anfang erscheinen wohl auch hier die dunkel gefärbten Körner der primären Koazervation und sinkt die Plasmaviskosität, beinahe gleichzeitig entwickeln sich aber die scharf umgrenzten Räume der dünnflüssigen Phase der sekundären Koazervation (Fig. 19). Die Chloroplasten scheinen keinen Farbstoff aufzunehmen, eine Anfärbung des Zellkerns konnte nicht beobachtet werden. Die dünne Solphase nimmt immer mehr Platz ein und erweckt schon in diesem Zustand den Eindruck, daß kolloidaldisperse Systeme in molekulardisperse verändert wurden und die Hautschicht der Solphase semipermeabel ist, da diese Räume unverkennbar einen starken Druck auf ihre Umgebung ausüben (Fig. 20). Dieser Druck steigt am Ende des Vorganges so an, daß es zu einer Plasmorhexis kommt: Das Protoplasma wird mit Entmischungskörnchen und Öltropfen durch die Rhaphespalte gepreßt (Fig. 21).

Die Plasmorhexis ist charakteristisch für die durch Methylenblau verursachte Nekrobiose bei *Nitzschia thermalis*. Es muß also angenommen werden, daß die eingedrungenen Farbstoffmoleküle mit den kolloidalen Veränderungen auch semipermeable Hautschichten verursachen. Der Mechanismus des Vorganges ist nicht klar zu erkennen; man könnte vielleicht annehmen, daß gebundene Enzyme frei werden und die großen Proteinmoleküle spalten. Diese Annahme ist aber nur eine Arbeitshypothese.

Rhodamin B

Nitzschia palea: Die eindringenden Rhodamin-B-Moleküle verursachen eine diffuse Färbung des gesamten Protoplasten. Auffallend ist die starke Farbstoffaufnahme durch den Chloroplasten, der aber dadurch sofort desorganisiert wird. Das Chlorophyll diffundiert aus den Plastiden beinahe sofort aus und färbt die Öltropfen lebhaft grün (Fig. 22). Entmischungen scheint Rhodamin B im Protoplasma nicht zu verursachen, es sei denn, daß die Körner

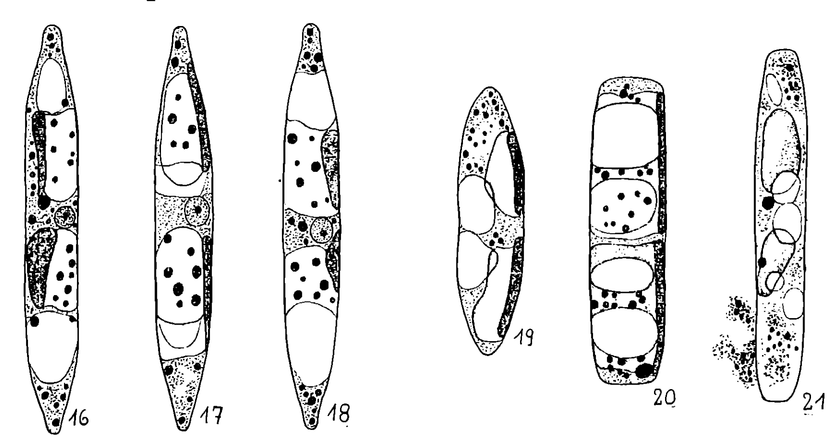


Fig. 16—18. Methylenblauvergiftung. *Nitzschia palea.* — Fig. 19—21. Dasselbe. *N. thermalis.* Einzelheiten vgl. im Text.

der wasserarmen Phase für die Beobachtung zu klein wären. Die Druckverhältnisse im Zellinneren verändern sich aber doch (Fig. 23). Die Reste der Chloroplasten werden in Zwangsformen gedrückt, stark deformiert, was analog zu den anderen, mit anderen Farbstoffen verursachten Druckveränderungen, als ein Zeichen für Entmischungen aufgefaßt werden kann. Hier sei aber darauf hingewiesen, daß jede Veränderung des Druckes nur durch Übergang von Kolloiden in echte Lösungen erklärlich ist. Ein solcher Vorgang ist auch ohne Entmischung denkbar. Fig. 24 zeigt einen prämortalen Zustand, in dem die Chloroplasten lebhaft rot, das Plasma diffus rosa und die hier zufällig großen Öltropfen leuchtend grün gefärbt sind. Nach diesem Stadium tritt die Desorganisation ohne Entmischungen oder Koazervationen sehr schnell ein. Ich möchte hervorheben, daß ich unter den vielen hundert beobachteten *Nitzschia palea*-Zellen keine einzige fand,

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

die eine Plasmorhexis gezeigt hätte. Die Zellen auf Fig. 22—24 waren mit 1 mol. NaCl-Lösung zu plasmolysieren, konnten also nicht völlig desorganisiert sein.

Nitzschia thermalis: Zeigt am Anfang teilweise ähnliche protoplasmatische Verhältnisse: Der ganze Protoplast samt Chromatophor färbt sich diffus an. Die Chromatophoren werden rasch inaktiviert und ihr Chlorophyll a geht in die Öltropfen über. Eine grundsätzliche Abweichung gegenüber *Nitzschia palea*: Schon in diesem frühen Zustand erscheinen zwei scharf umgrenzte Räume, die einer entmischten Solphase entsprechen. Die Viskosität der Flüssigkeit in jenen Räumen konnte nicht ermittelt werden, da keine Brownsche Bewegungen sichtbar waren. Die Form der Körper ist aber immer rundlich; es ist also kaum anzunehmen, daß sie eine höhere Viskosität haben könnten (Fig. 25). Im Protoplasma konnten keine Koazervationskügelchen entdeckt werden. Vielleicht blieben die Koazervate unter der Grenze der lichtmikroskopischen Auflösbarkeit oder waren ungefärbt. Einen weiteren entwickelten Zustand der Rhodamin-B-Vergiftung stellt Fig. 26 dar, wo die Solphase und die lebhaft grün gefärbten Öltropfen usw. ebenso wie bei Fig. 25 sichtbar sind. In diesem Zustand ist aber die Wirkung eines erhöhten inneren Druckes deutlich, indem die Chromatophoren in eine Zwangsform gepreßt wurden. Daß dieser Druck besonders hoch sein muß, zeigt die kurz danach eintretende Plasmorhexis, die das Protoplasma durch die Kanalraphe auspreßt (Fig. 27). Ob die, in solchen desorganisierten Zellresten erscheinenden stark gefärbten Kügelchen Koazervate sind, konnte nicht entschieden werden. Die Zellkerne sind schon am Anfang der Vergiftung angefärbt, konnten aber auf Fig. 25 u. 26 aus technischen Gründen nicht eingezeichnet werden.

Janusgrün

Nitzschia palea: Der Farbstoff erwies sich als der giftigste und rief sehr schnell große Veränderungen im Protoplasma hervor. Sofort färbte sich das Protoplasma grün an und die Chromatophoren wurden in üblicher Weise desorganisiert, indem ihr Chlorophyll beinahe unmittelbar hinausdiffundierte und durch die Öltropfen aufgenommen wurde. Manchmal (Fig. 28) erscheinen im Protoplasma Koazervatkügelchen, die dazugehörende wässerige Phase konnte aber nicht, oder mindestens nicht scharf abgegrenzt, entdeckt werden. Dagegen erhöhte sich der innere osmotische Druck der Zelle, Öltropfen und andere Zellbestandteile werden verschoben, es kann auch zu einem Austritt des Protoplasmas

oder gewisser Bestandteile des Protoplasmas kommen. Im Verlauf dieser Färbung konnte ich erstmalig die Erscheinung von kugelrunden, stark grün gefärbten Tröpfchen über den Carinalporen des Raphesystems beobachten. Die chemische Natur dieser Perlen, die manchmal erstaunlich regelmäßig über dem Kiel erscheinen, konnte nicht ermittelt werden. Aus ihren Farbeigenschaften geht aber hervor, daß sie keine Öltropfen sind, sondern vielleicht aus Eiweißen bestehen. Die Tropfen können sich von der Kanalraphe loslösen, behalten aber ihre kugelrunde Form und bleiben scharf umgrenzt, sind also wasserunlöslich. Wahrscheinlich sind sie von einer Hautschicht begrenzt. In anderen Fällen waren in der Zelle

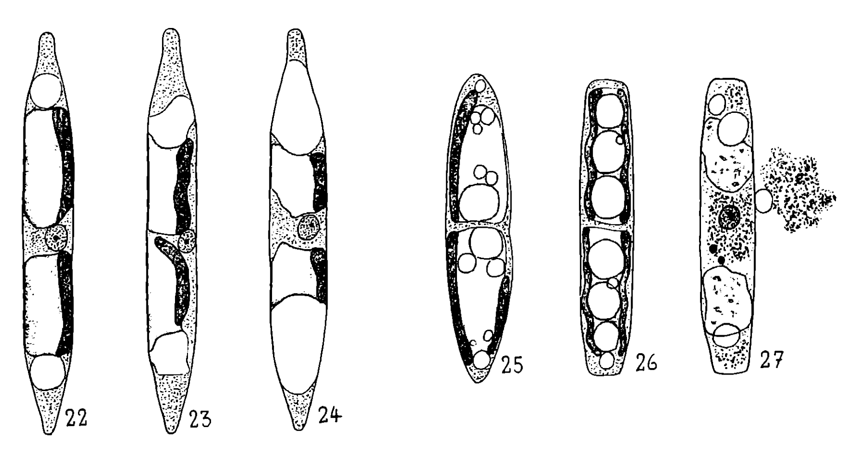


Fig. 22—24. Rhodamin B-Vergiftung. *Nitzschia palea.* — Fig. 25—27. Dasselbe. *N. thermalis.* Einzelheiten vgl. im Text.

keine Koazervatkügelchen sichtbar, auch hier mußte aber starker innerer Druck herrschen, da sowohl die Chromatophoren in Zwangsformen, als auch die beschriebenen Kügelchen durch die Raphe ausgepreßt waren (Fig. 29). Wieweit die Zusammenpressung der Chromatophoren gehen kann, stellt Fig. 30 dar. Daß ihre Viskosität nicht besonders hoch sein kann, zeigt die Zwangsform neben dem unteren Öltropfen der Fig. 30. Spezifisch für die Janusgrün-Färbung ist das Fehlen von Plasmorhexis. Die im Laufe der Janusgrün-Nekrobiose entstandenen Entmischungsgebilde haben eine Struktur und Viskosität, die das Beibehalten ihrer Kugelform und deren scharfe Abgrenzung gestatten. In diesem Zusammenhang möchte ich auf die ausgezeichneten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Kanalraphe von *Nitzschia sp.*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

und *Nitzschia palea* durch Drum (1962) und Drum and Pankratz (1964) aufmerksam machen. Durch das gütige Entgegenkommen des Herrn Drum stehen die Originalaufnahmen zu meiner Verfügung. Möglicherweise gehören die durch Janusgrün entmischten und durch den inneren Druck ausgepreßten Stoffe zu den komplizierten protoplasmatischen Stoffen, die vielleicht irgendwie mit der Bewegung der Zellen in Zusammenhang stehen. Der innere Druck wird auch dadurch deutlich, daß später im Laufe des Vorgangs selbst die Öltropfen durch die Raphe, wahrscheinlich durch die Poren der Kiele, gepreßt werden (Fig. 31 u. 32). Mit dem Austritt der Öltropfen ist die Desorganisation der Zellen beendet.

Nitzschia thermalis: Bei *Nitzschia thermalis* verläuft der Vergiftungsvorgang sehr ähnlich wie bei *Nitzschia palea*. Nachdem auch hier das Protoplasma angefärbt ist und die Chromatophoren durch einen starken inneren Druck an die Zellwand gepreßt sind, treten die oben beschriebenen Perlen scharf umgrenzt aus der Raphe, zeigen eine grünblaue Färbung und bleiben bis zum Absterben völlig unverändert (Fig. 33). Manchmal können die Kugeln beim Austritt miteinander verschmelzen. Sie erscheinen in beiden Raphen einer Zelle (Fig. 34). Weder die optische Manifestation der wässerigen Phase noch der Austritt von Öltropfen oder anderen Protoplasmateilen konnte beobachtet werden.

Es wurde in dieser Arbeit zwar versucht, die Vakuolen in normalen, unversehrten Zellen zu lokalisieren, diese Versuche waren aber erfolglos. So muß in diesem Fall, wie wahrscheinlich in allen Fällen, angenommen werden, daß die „Vakuolen" mehr als hypothetische Bestandteile einer Zelle aufzufassen sind. Da es unmöglich war, in der lebenden *Nitzschia*-Zelle die Vakuolen zu beobachten, mußte ich annehmen, daß im Protoplasma nebeneinander wohl verschieden viskose Teile vorkommen müssen, diese Phase aber keine konstanten Strukturelemente des Protoplasmas sind. So ist auch jede Untersuchung überflüssig, die volle oder leere Zellsäfte bei den Algen, besonders bei Diatomeen, feststellen möchte. Schon Huber (1955: 938—939) stellte fest, daß die Algen beinahe immer volle Zellsäfte hätten, womit wohl gemeint wurde, daß sich die mit der Lebendfärbung verbundenen kolloidalen Veränderungen in jedem Teil des Protoplasmas abspielen können. Die Definition der Vakuolen ist ja für höhere Pflanzen erstellt worden, wo die Koazervation während der Entwicklung der Zelle sichtbar und die Abgrenzung der wässerigen Phasen deutlicher ist. Besonders die Zellen, die in einer der Phasen optisch sichtbare Farbstoffe führen, haben viel zu dem Entstehen eines Vakuolen-

begriffs beigetragen. Es ist zweifellos, daß die Anthozyane und Flavone meistens in einer wässerigen Phase vorkommen, also im „Zellsaft“ gelöst sind. Das ist aber sicher nicht immer der Fall, wie es z. B. die Untersuchungen von *Pelargonium* und *Pulmonaria* bewiesen haben. Moderne elektronenmikroskopische Untersuchungen, etwa von DRUM (1962) und DRUM and PANKRATZ (1964), haben weder Tonoplasten noch Vakuolen nachweisen können. Auch HÖFLER (1962) kann in einer kleinen Zusammenfassung der Ergebnisse elektronenmikroskopischer Zell-Forschung nichts Bestimmtes über das Entstehen und Entwicklungsgeschichte von Vakuolen angeben, hebt aber hervor, daß die Vakuolen vollentwickelter Zellen nicht mit dem endoplasmatischen Reticulum meristematischer Zellen, in denen keine „Vakuolen“ zu entdecken waren, zu verbinden sind. Da die Diatomeen immer meristematisch bleiben, besitzen sie wohl keine Gebilde, die mit den „Vakuolen“ nicht meristematischer, also alternder Zellen der höheren Pflanzen zu vergleichen wären.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die verschiedenen Farbstoffe durch verschiedene Phasen der Plasmakolloide gebunden werden. Einmal färbte sich der Chromatophor deutlicher, in anderen Fällen der Zellkern, einmal entstanden größere Entmischungskügelchen im Protoplasma, in anderen Fällen waren solche lichtmikroskopisch überhaupt nicht zu beobachten. Die wässerigen

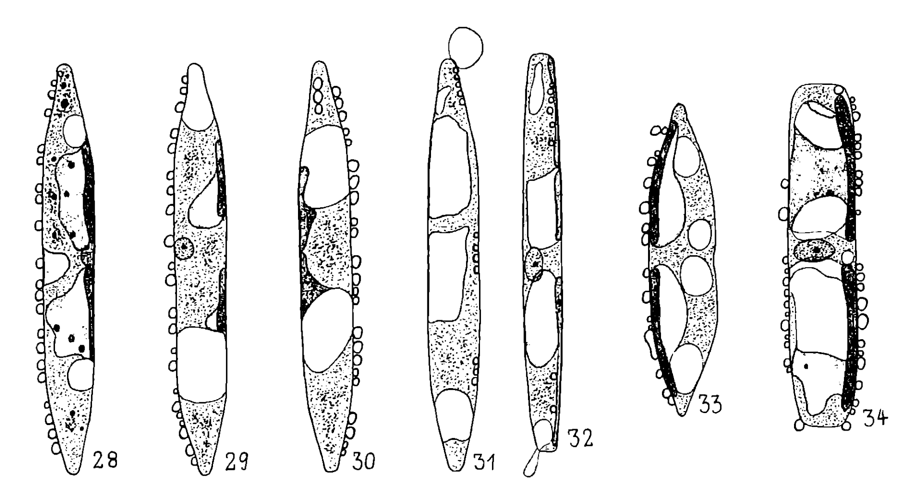


Fig. 28—32. Janusgrünvergiftung. *Nitzschia palea*. — Fig. 33, 34. Dasselbe. *N. thermalis*. Einzelheiten vgl. im Text.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Phasen und ihre optische Manifestation waren ebenfalls von den Farbstoffmolekülen abhängig, so daß bei Diatomeen von einem einheitlichen Stoff, der alle basischen Farbstoffe binden sollte, keine Rede sein kann. So ist hier der Begriff „Speicherstoffe" im üblichen Sinn nicht am Platz, da die speichernden Plasmakolloide doch immer verschieden sein müssen. Es ist möglich, daß die kolloidalen Großmoleküle des Protoplasmas, die Eiweiße, unter Umständen mit basischen Farbstoffen in Verbindung treten können.

Eine besondere Erwähnung verdient die Plasmorhexis nach Lebendfärbung mit gewissen basischen Farbstoffen wie Methylenblau, besonders aber Janusgrün und Rhodamin B. Im Text wurde schon darauf hingewiesen, daß diese Erscheinung, die regelmäßig auftrat, nur dann erklärlich ist, wenn wir annehmen, daß die Farbstoffvergiftung vorher kolloidale Stoffe durch Spaltung der Moleküle bis zu echter Lösung verändert hat. Die Farbstoffvergiftung stellt also eine chemische Verbindung der Farbstoffmoleküle mit den Proteinen des Plasmas dar.

Entweder können Proteinketten irreversibel miteinander verbunden werden (Koagulation) oder aber die großen Moleküle in ihre Bausteine (Aminosäuren) zerlegt werden. Dieser Vorgang böte eine befriedigende Erklärung der beobachteten Plasmorhexis.

In beiden Fällen ist der Vorgang irreversibel und letal. Dies bedeutet, daß die Farbstoffmoleküle lebenswichtige Plasmabestandteile verändern und dadurch inaktivieren.

Die Versuche belegen erneut, daß jeder Farbstoff eine charakteristische Wirkungsweise hat, und überdies, daß zwei einander so nahe stehende Diatomeen wie *Nitzschia palea* und *Nitzschia thermalis* auf die Farbstoffe verschieden reagieren können. Diese Verschiedenheiten sind nur dann möglich, wenn die Struktur des Protoplasmas genotypisch artcharakteristisch ist.

Zusammenfassung

1. Die spezifische Wirkungsweise verschiedener Farbstoffe und die artspezifischen Reaktionen der untersuchten *Nitzschien* auf Farbstoffvergiftungen werden beschrieben.

2. Es wurde versucht, die beobachteten protoplasmatischen Erscheinungen durch chemische und kolloidale Veränderungen zu erklären.

3. Die Koazervationen verlaufen sowohl nach Zellart als auch nach Farbstoff verschieden, es konnten daher nicht immer optisch manifeste, wasserarme und wasserreiche Phasen unterschieden werden. Der Verlauf der Vergiftung hat aber in jedem Fall die Entmischung (Koazervation) zur Folge.

4. Durch echte Lösung ursprünglich kolloidal verbundener Moleküle nach Farbstoffvergiftung kann in der gefärbten Zelle ein erhöhter osmotischer Druck entstehen, der den Zelltod zur Folge hat.

5. Alle Plasma-Kolloide können durch Farbstoffvergiftung verändert werden; es darf also kein einzelner Bestandteil der Diatomeen-Zelle besonders für die Farbstoffaufnahme verantwortlich gemacht werden. Auch die Kolloide der Chloroplasten können Färbung zeigen.

Literatur

CHOLNOKY, B. J., 1937: Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. Ungarische Akad. d. Wiss., Matematikai és Természettudományi Ertesitö, Bd. 56: 940—981.

DRUM, R. W., 1962: The non-siliceous fine structure of a diatom. Fifth Internat. Congress for Electron Microscopy, New-York; UU — 14. 2 Seiten.

DRUM, R. W. and PANKRATZ, H. S., 1964: Pyrenoids, Raphes and other fine Structure in Diatoms. American Journal of Botany, Vol. 51, No. 4: 405—418.

HIRN, S., 1953: Vitalfärbung von Diatomeen mit basischen Farbstoffen. Sitzungsberichte d. Österr. Akad. d. Wiss., math.-natw. Kl., Abt. I, Bd. 162: 571—595.

HÖFLER, K., 1962: Das Protoplasma im Elektronenmikroskop. Österr. Apotheker-Zeitung. Bd. 14, Folge 18: 247—249.

HUBER, E., 1955: Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen mit leeren und vollen Zellsäften. Sitzungsberichte d. Österr. Akad. d. Wiss., math.-natw. Kl., Abt. I, Bd. 164: 909—943.

STRUGGER, S., 1940: Fluoreszenzmikroskpopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 73, 97.